

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-93195

(P2000-93195A)

(43)公開日 平成12年4月4日(2000.4.4)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

FI

テーマコート\* (参考)

C 1 2 Q 1/10

C 1 2 Q 1/10

4 B 0 6 3

1/34

1/34

1/48

1/48

Z

// (C 1 2 Q 1/10

C 1 2 R 1:19)

審査請求 未請求 請求項の数 3 OL (全 8 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平10-270370

(22) 出願日

平成10年9月24日(1998.9.24)

(71)出題人 000004189

日本水産株式会社

東京都千代田区大手町2丁目6番2号

(72)発明者 山田 彰一

八王子市北野町559-6 日本水産株式会社  
中央研究所内

(72)発明者 大橋 英治

八王子市北野町559-6 日本水産株式会社  
社中央研究所内

(74) 代理人 100102314

弁理士 須藤 阿佐子

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ06 QQ35 QR07

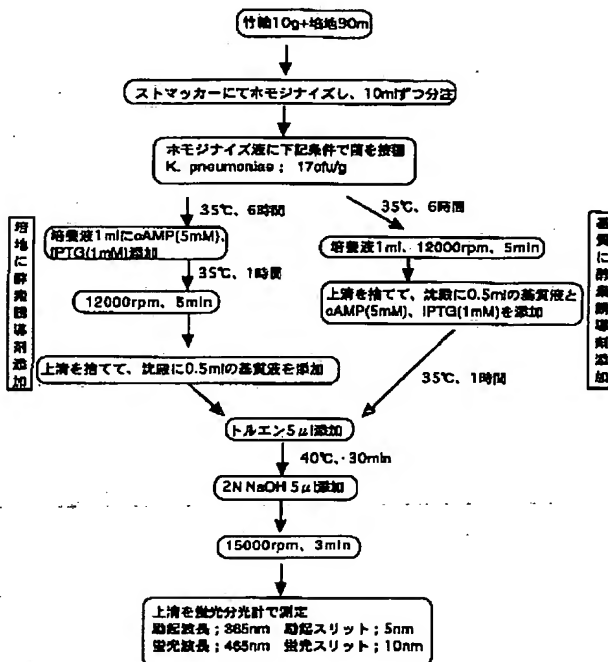
QR41 QR42 QR66 QS20 QX02

(54)【発明の名称】 大腸菌群の迅速検出法

(57) 【要約】

【課題】 食品中の大腸菌群の有無を、必要によりその数を迅速に正確に判定する方法を提供すること。

【解決手段】 大腸菌群を該 $\beta$ ガラクトシダーゼを指標に検出する方法であって、検体または該検体を一定量含む被検液を、大腸菌群特異的酵素である $\beta$ ガラクトシダーゼの生成量が増大するように培養し、該 $\beta$ ガラクトシダーゼの酵素活性を測定する。 $\beta$ ガラクトシダーゼの生成量を増大させるため、アデノシン3', 5' サイクリックリン酸(cAMP)および/またはヘキサキナーゼの存在下で培養する。イソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノサイド(IPTG)の存在下で培養する、および/または(5)基質として $\beta$ ガラクトシダーゼの感度の良い蛍光基質、好ましくは4-メチルウンベリフェリル- $\beta$ -D-ガラクトシドを用いて培養する工程と併用することが好ましい。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 大腸菌群を該 $\beta$ ガラクトシダーゼを指標に検出する方法であって、検体または該検体を一定量含む被検液を、大腸菌群特異的酵素である $\beta$ ガラクトシダーゼの生成量が増大するように培養し、該 $\beta$ ガラクトシダーゼの酵素活性を測定することを特徴とする大腸菌群の迅速検出法。

【請求項2】 アデノシン3', 5' サイクリックーリン酸(cAMP)および/またはグルコースを除去するための酵素の存在下で培養する請求項1の大腸菌群の迅速検出法。

【請求項3】 グルコースを除去するための酵素がヘキソキナーゼである請求項2の大腸菌群の迅速検出法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業の属する技術分野】本発明は、大腸菌群の迅速検出法に関する。

【0002】

【従来の技術】大腸菌群はBGLB培地において、酸とガスを生成する菌である。この酸やガスを測定する方法によると培養に48時間かかる。しかし、チルド流通している日配品のような比較的賞味期限の短い製品の場合、検査結果が出る前に製品は出荷されており、製品の安全性を確認することができず、その安全が危惧される。そのため迅速に大腸菌群を測定する方法が切望されている。大腸菌群を迅速に検出するには、大腸菌群特異的酵素である $\beta$ ガラクトシダーゼの酵素活性を測定する方法、培養中の培地のインピーダンス変化を感知する方法、消費酸素や発生する二酸化炭素を測定する方法、菌体内のATPを利用して発光させる方法、PCRによる遺伝子増幅などが考えられる。しかし、大腸菌群の検出時間を8時間以内とした場合、いずれの方法も、検出系が確立されていないものか、確立されていてもこの時間内では十分な感度が得られていないものであるというのが現状である。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は食品中の大腸菌群の有無を、必要によりその数を迅速に正確に判定する方法を提供することを目的としている。

【0004】

【課題を解決するための手段】対象物に大腸菌群が存在することを調べるにあたり、大腸菌群の特異的酵素 $\beta$ ガラクトシダーゼを指標にする。その $\beta$ ガラクトシダーゼの生成量を増大させてからその酵素活性を測定する。すなわち、本発明は、大腸菌群を該 $\beta$ ガラクトシダーゼを指標に検出する方法であって、検体または該検体を一定量含む被検液を、大腸菌群特異的酵素である $\beta$ ガラクトシダーゼの生成量が増大するように培養し、該 $\beta$ ガラクトシダーゼの酵素活性を測定することを特徴とする大腸菌群の迅速検出法を要旨としている。上記の $\beta$ ガラクト

シダーゼの生成量が増大するように培養する手段として、以下の(a)および/または(b)手段が本出願前周知である。

(a) イソプロピルー $\beta$ -D-チオガラクトピラノサイド(IPTG)の存在下で培養する。

(b) 基質として $\beta$ ガラクトシダーゼの感度の良い蛍光基質を用いて培養する。該蛍光基質として、好ましくは4-メチルウンベリフェリルー $\beta$ -D-ガラクトシドを用いる。

10 【0005】本発明は、 $\beta$ ガラクトシダーゼの生成量が増大するように培養する手段が、以下の(1)および/または(2)の手段であることを特徴としている。

(1) アデノシン3', 5' サイクリックーリン酸(cAMP)の存在下で培養する。

(2) グルコースを除去するための酵素の存在下で培養する。

上記のグルコースを除去するための酵素の好ましい例として、ヘキソキナーゼを挙げることができる。

20 【0006】したがって、本発明の大腸菌群の迅速検出法は、大腸菌群を該 $\beta$ ガラクトシダーゼを指標に検出する方法であって、検体または該検体を一定量含む被検液を、以下に示した(a)の手段、(b)の手段、ならびに、(1)および/または(2)の手段で大腸菌群特異的酵素である $\beta$ ガラクトシダーゼの生成量が増大するように培養し、該 $\beta$ ガラクトシダーゼの酵素活性を測定する態様を包含している。

(a) イソプロピルー $\beta$ -D-チオガラクトピラノサイド(IPTG)の存在下で培養する。

30 (b) 基質として $\beta$ ガラクトシダーゼの感度の良い蛍光基質を用いて培養する。該蛍光基質として、好ましくは4-メチルウンベリフェリルー $\beta$ -D-ガラクトシドを用いる。

(1) アデノシン3', 5' サイクリックーリン酸(cAMP)および/または(2) グルコースを除去するための酵素の存在下で培養する。

【0007】

40 【発明の実施の形態】本発明の大腸菌群の迅速検出法において、検体または該検体を一定量含む被検液を、大腸菌群特異的酵素である $\beta$ ガラクトシダーゼの生成量が増大するように培養するとき、例えば基質として $\beta$ ガラクトシダーゼの感度の良い蛍光基質、好ましくは4-メチルウンベリフェリルー $\beta$ -D-ガラクトシドを用いる。 $\beta$ ガラクトシダーゼの生成量をあげるために、イソプロピルー $\beta$ -D-チオガラクトピラノサイド(IPTG)を使用する。さらに $\beta$ ガラクトシダーゼの生成量をあげるために、アデノシン3', 5' サイクリックーリン酸(cAMP)および/または反応液中のグルコースを除去するための酵素、好ましくはヘキソキナーゼを使用する。グルコースを除去するための酵素としては、他にグルコースオキシダーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼ等

50

が挙げられる。

【0008】食品中の大腸菌群の有無を8時間以内で判定するため、大腸菌群特異的酵素であるβガラクトシダーゼの酵素活性を指標とした。βガラクトシダーゼの基質として種々の合成誘導体が知られているが、最も感度がよいとされている蛍光基質、なかでも蛍光強度が強い4-メチルウンベリフェリル-β-D-ガラクトシドを用いた。この基質を用いた方法(特公昭58-17598号)は存在するが、その方法では食品1g中に1cfuといったごく少量の大腸菌群しか存在しない場合、8時間以内の検出は困難である。

【0009】そのため、大腸菌群のβガラクトシダーゼ生成量を増大させることで検出感度を上げることを試みた。既に上記方法にも示されているイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノサイド(IPTG)とアデノシン3'、5'サイクリックリン酸(cAMP)とヘキソキナーゼを添加することによって、相乗的にβガラクトシダーゼの生成量を増大することができた。ヘキソキナーゼの添加効果についてはまだ報告がされていない。

【0010】本発明の検出法が対象とする大腸菌群：グラム陰性の桿菌で乳糖を分解し酸とガスを産生する微生物であり、例えば、エシェリア属、サイトロバクター属、クレブシエラ属、エンテロバクター属等があげられる。

使用する培地：大腸菌群のみが増殖できる何らかの選択圧をかけた培地が好ましい。

酵素誘導剤の添加量：IPTG 0.1mM~10mM

#### 1) 使用した培地

ポリペプトン

NaCl

酵母エキス

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

SDS

KNO<sub>3</sub>

ビルビン酸ナトリウム

\* M, cAMP 0.1mM~100mM、ヘキソキナーゼ 0.01U~5U

【0011】感度の良い蛍光基質：4-メチルウンベリフェリル-β-D-ガラクトシド、3-カルボキシウンベリフェリル-β-D-ガラクトシド、フルオレジン-ダイ-β-D-ガラクトシド、C<sub>12</sub>-フルオレジン-ダイ-β-D-ガラクトシド

#### 【0012】

【作用】本発明ではIPTG、cAMP、ヘキソキナーゼの添加によって大腸菌群のβガラクトシダーゼの生成量を増大させることができ、8時間での検出が可能となる。それぞれの役割はIPTGがβガラクトシダーゼ遺伝子の転写をONにし、cAMPは転写因子と結合してその転写を促進する。ヘキソキナーゼはグルコースをグルコース-6-リン酸にする酵素である。グルコースが存在するとβガラクトシダーゼの生成が阻害されるため、反応液中からグルコースをなくすために添加する。

#### 【0013】

【実施例】本願発明の詳細を実施例で説明する。本願発明はこれら実施例によって何ら限定されるものではない。

#### 【0014】実施例1

代表的な大腸菌群である大腸菌とクレブシエラ・ニューモニア(Klebsiellapneumoniae)を用いて、β-ガラクトシダーゼ生成量に影響を及ぼすcAMP、IPTG、ヘキソキナーゼの相乗効果およびその添加時期による影響についての検討。

15g(培地1リットルあたり)

5g

5g

2.5g

0.1g

1g

1g

#### 2) 基質液

12.5mg 4-メチルウンベリフェリル-β-D-ガラクトシド/50ml H<sub>2</sub>Oを加熱溶解後、0.5M Tris-HCl(pH9.0)を0.4ml加え、陰イオン交換カラムを通しHClでpHを7.2に調整後0.45μmのフィルターでろ過。この液を9に対して1の割合で0.5MのPIPES(pH7.2)を加え基質液とする。

#### 3) 蛍光値の陽性、陰性の判定

菌が存在していないときの蛍光値は10-15、蛍光値が20以上であったとき陽性とした。20未満のときには陰性とした。

【0015】実験1：cAMP、IPTG、ヘキソキナーゼの添加効果

図1に示す手順で、竹輪10gと培地90mlをストマ※50

※ ユーザーにてホモジナイズし、10mlずつ分注し、該ホモジナイズ液に菌(大腸菌12cfu/g、K. pneumoniae 22cfu/g)を接種し、35℃、6時間培養する。培養液を12000rpmで5分間遠心分離して上清を捨て、沈殿に5mlの基質液を添加し、よく攪拌後、0.5mlずつ分注し、各々の酵素誘導剤を添加し、35℃、1時間反応を行い、さらにトルエン5μlを添加し、40℃、30分間反応を行った。この反応液に2NのNaOH 5μlを添加し、12000rpmで5分間遠心分離してから、365nmの励起波長、5nmの励起スリットで紫外線を照射して励起させ、465nmの蛍光波長、10nmの蛍光スリットの蛍光を蛍光分光計で測定する。大腸菌を添加した場合の結果を表1に、Klebsiella pneumoniaeを添加した場合の結果を表2に、それぞれ示す。

【0016】

\* \* 【表1】

大腸菌を添加した場合			
cAMP 5mM	IPTG 1mM	ヘキソキナーゼ 0.3U	蛍光値
-	-	-	12
+	-	-	12
-	+	-	220
-	-	+	11
+	+	-	655
-	+	+	319
+	-	+	21
+	+	+	440

【0017】

※ ※ 【表2】

K.pneumoniae を添加した場合			
cAMP 10mM	IPTG 1mM	ヘキソキナーゼ 0.3U	蛍光値
-	-	-	12
+	-	-	13
-	+	-	16
-	-	+	12
+	+	-	22
-	+	+	19
+	-	+	13
+	+	+	31

【0018】実験2：cAMP、IPTGの添加時期  
図2に示すとおり、竹輪10gと培地90mlをストマ  
ッカーにてホモジナイズし、10mlずつ分注し、該ホ  
モジナイズ液に菌（K. pneumoniae 17cfu/g）を接種し、35℃、6時間培養する。一方の培  
養液1mlを12000rpmで5分間遠心分離して上  
清を捨てて、沈殿に0.5mlの基質液とcAMP（5  
mM）、IPTG（1mM）を添加し、他方の培養液1  
mlにcAMP（5mM）、IPTG（1mM）を添加  
し、35℃、1時間培養してから12000rpmで5★

★分間遠心分離して上清を捨てて、沈殿に0.5mlの基  
質液を添加し、両者ともそれぞれトルエン5μlを添加  
し、40℃、30分間反応を行った。この反応液それぞ  
れに2NのNaOH5μlを添加し、15000rpm  
で3分間遠心分離してから、365nmの励起波長、5  
nmの励起スリットで紫外線を照射して励起させ、46  
5nmの蛍光波長、10nmの蛍光スリットの蛍光を蛍  
光分光計で測定する。結果を表3に示す。

【0019】

【表3】

	初発（cfu/g）	蛍光値（培地に 酵素誘導剤添加）	蛍光値（基質に 酵素誘導剤添加）
Klebsiella pneumoniae	17	15	32

【0020】結果

表1、表2より大腸菌、クレブシエラ ニューモニアに☆50 が確認された。また、表3よりこれらの酵素誘導剤は基

☆においてcAMP、IPTG、ヘキソキナーゼの併用効果

質液に直接添加する方が好ましいことが示された。

#### 【0021】実施例2

図3に示す手順で、大腸菌、*Klebsiella pneumoniae*を竹輪破砕物に加え、蛍光値を測定する。酵素誘導剤の添加量は、大腸菌の場合、cAMP 10mM、IPTG 1\*

\* mM、ヘキソキナーゼ2Uであり、*K. pneumoniae*の場合、cAMP 10mM、IPTG 1mM、ヘキソキナーゼ0.2Uである。結果を表4に示す。

#### 【0022】

【表4】

	初発 (cfu/g)	蛍光値
大腸菌	1	27
	10	506
<i>K. pneumoniae</i>	2	25
	20	167

#### 【0023】実施例3

図3に示す手順で、種々の大腸菌群を竹輪破砕物に加え、蛍光値を測定する。対象菌は日本で市販されている※

※大腸菌群を用いた。結果を表5に示す。

#### 【0024】

【表5】

		初発 (cfu/g)	蛍光値	酵素誘導剤 の条件
<i>Citrobacter freundii</i>	IFO12681	7	66	2
<i>Enterobacter arugenes</i>	IFO13534	2	21	1
<i>Enterobacter gergoviae</i>	JCM1234	1	851	2
<i>Enterobacter intermedium</i>	JCM1238	1	22	2
<i>Citrobacter diversus</i>	JCM1659	1	50	2
<i>Budvicia aquatica</i>	JCM3902	1	779	1
<i>Ewingella americana</i>	JCM5911	1	51	2
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	IFO13547	2	360	2
<i>Enterobacter sakazakii</i>	JCM1233	1	614	2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	JCM1665	2	100	2
<i>Leclercia adecarboxylate</i>	JCM1667	1	265	2
<i>Klebsiella terrigena</i>	JCM1687	1	24	1
<i>Escherichia vulneris</i>	JCM1688	1	40	2
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	JCM6096	1	25	2

酵素誘導剤の条件：

1：cAMP 10mM、IPTG 1mM、ヘキソキナーゼ2U

2：cAMP 10mM、IPTG 1mM、ヘキソキナーゼ0.2U

#### 【0025】

【発明の効果】食品中の大腸菌群の有無を、必要によりその数を迅速に正確に判定することができる。8時間での検出が可能となり、チルド流通している日配品のような比較的賞味期限の短い製品の大腸菌などの早期発見と★

★早期対応等が可能となる。

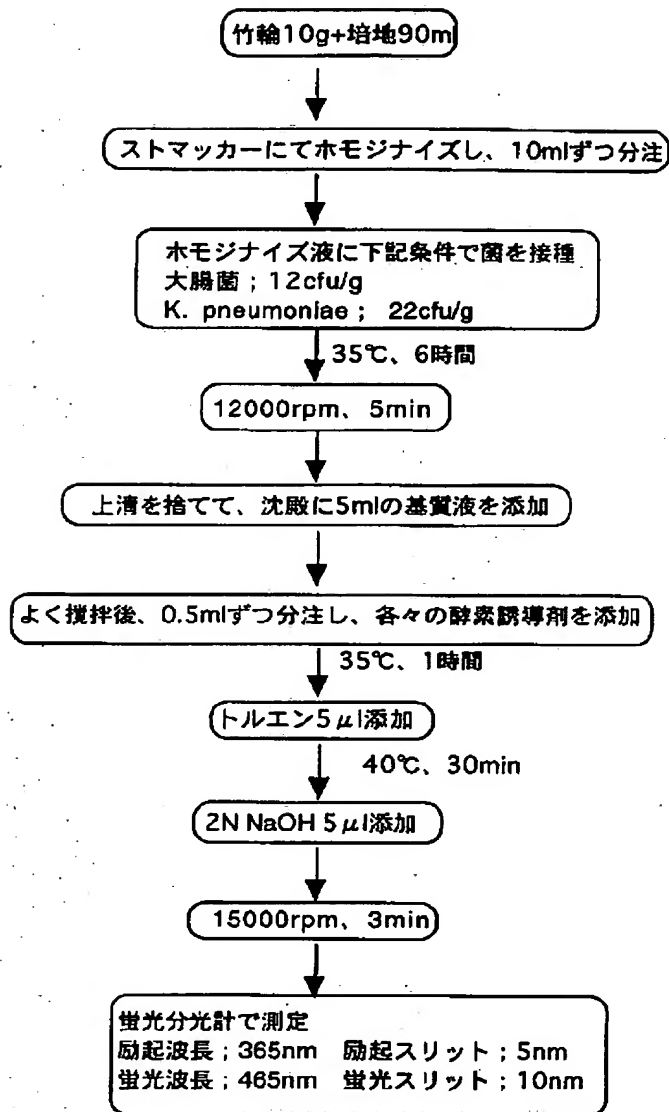
#### 【図面の簡単な説明】

【図1】酵素誘導剤を添加して培養した後でβ-ガラクトシダーゼの酵素活性を測定する操作手順を説明する工程図である。

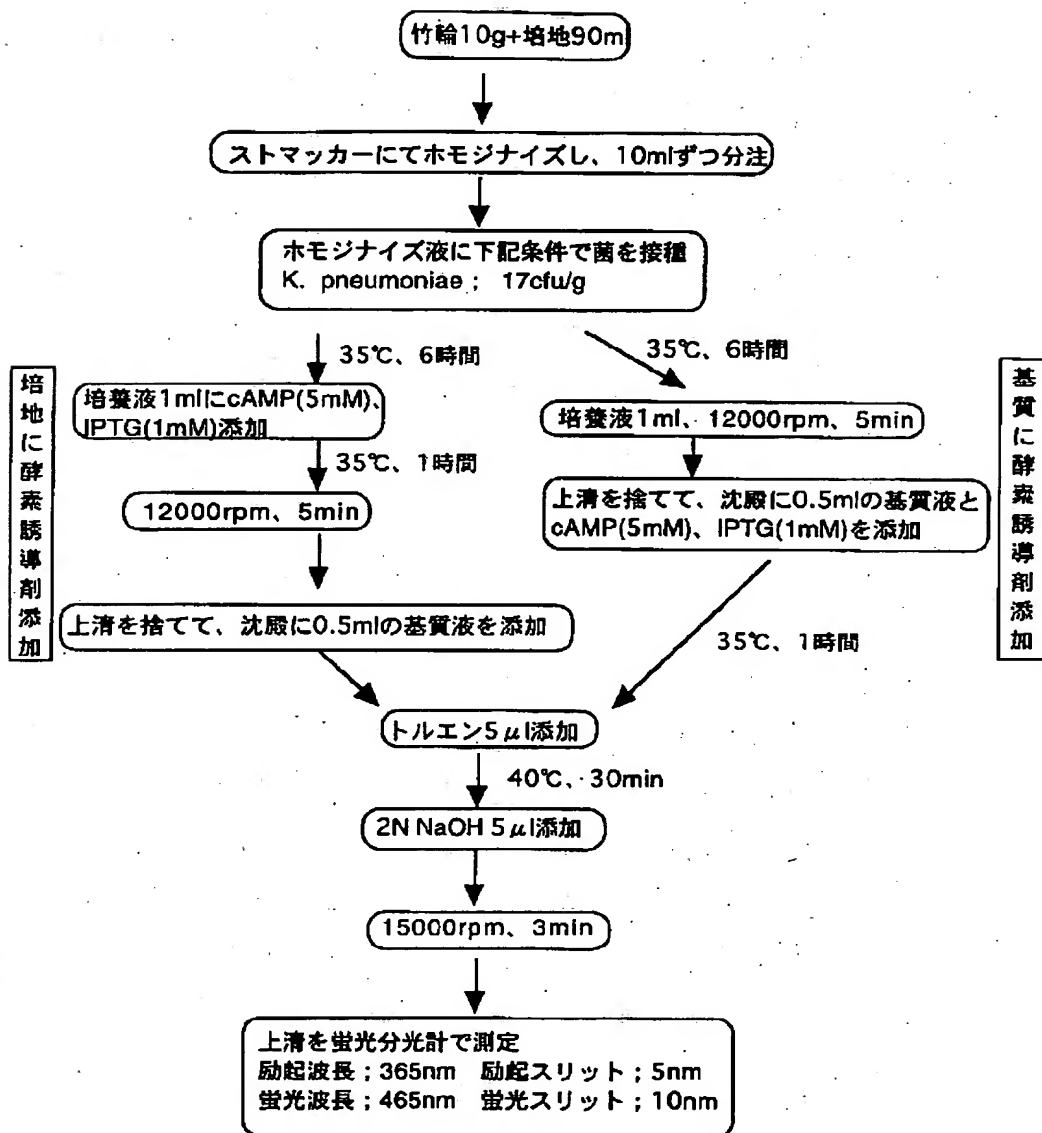
【図2】図1における*K. pneumoniae*を用いる場合の酵素誘導剤の添加の順序を変えたときの工程図である。

【図3】大腸菌、*Klebsiella pneumoniae*および種々の大腸菌群を竹輪破砕物に加え、蛍光値を測定するときの操作手順を説明する工程図である。

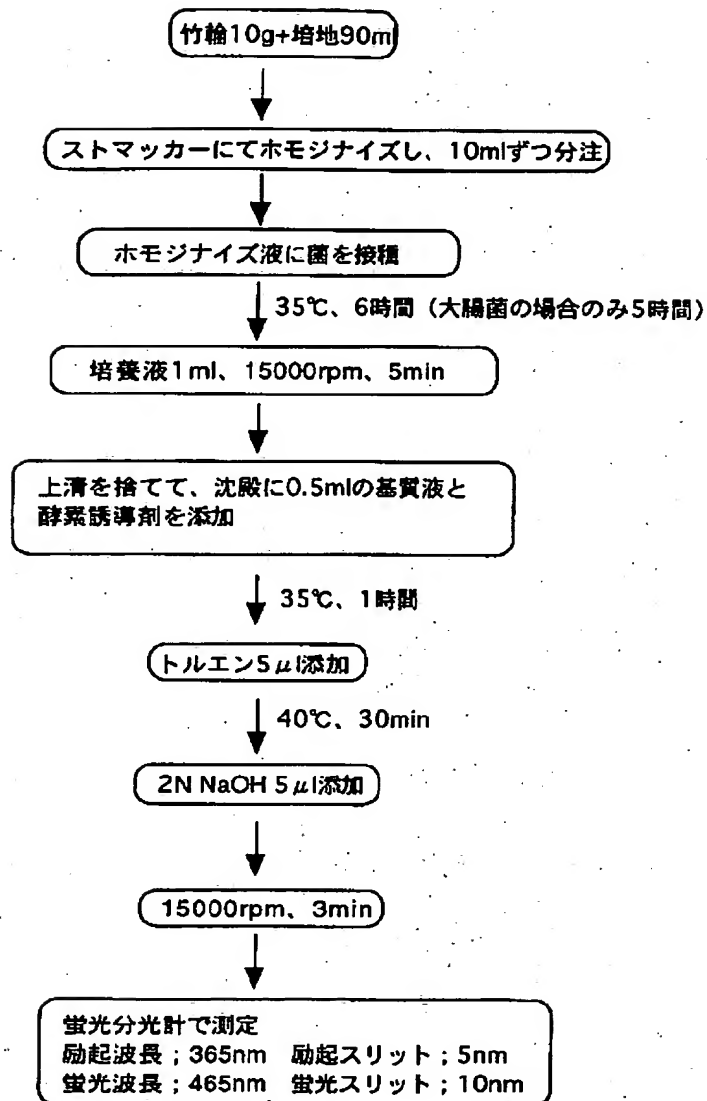
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.7

識別記号

F I

テーマコード(参考)

)

(C12Q 1/10

C12R 1:22)



**MACHINE-ASSISTED TRANSLATION (MAT):**

<b>(19)【発行国】</b> 日本国特許庁 ( J P )	<b>(19)[ISSUINGCOUNTRY]</b> Japan Patent Office (JP)
<b>(12)【公報種別】</b> 公開特許公報 ( A )	Laid-open (Kokai) patent application number (A)
<b>(11)【公開番号】</b> 特開 2 0 0 0 - 9 3 1 9 5 ( P 2 0 0 0 - 9 3 1 9 5 A )	<b>(11)[UNEXAMINEDPATENTNUMBER]</b> Unexamined-Japanese-Patent No. 2000-93195 (P2000-93195A)
<b>(43)【公開日】</b> 平成 1 2 年 4 月 4 日 ( 2 0 0 0 . 4 . 4 )	<b>(43)[DATEOFFIRSTPUBLICATION]</b> April 4, Heisei 12 (2000. 4.4)
<b>(54)【発明の名称】</b> 大腸菌群の迅速検出法	<b>(54)[TITLE]</b> The rapid detection method of a coliform group
<b>(51)【国際特許分類第 7 版】</b> C12Q 1/10 1/34 1/48 //(C12Q 1/10 C12R 1:19 ) (C12Q 1/10 C12R 1:22 )	<b>(51)[IPC]</b> C12Q 1/10 1/34 1/48 //(C12Q 1/10 C12R 1:19 ) (C12Q 1/10 C12R 1:22 )
<b>【 F I 】</b> C12Q 1/10 1/34 1/48 Z	<b>[FI]</b> C12Q 1/10 1/34 1/48 Z
<b>【審査請求】</b> 未請求	<b>[EXAMINATIONREQUEST]</b> UNREQUESTED
<b>【請求項の数】</b> 3	<b>[NUMBEROFCLAIMS]</b> 3
<b>【出願形態】</b> O L	<b>[Application form]</b> O L
<b>【全頁数】</b> 8	<b>[NUMBEROFPAGES]</b> 8

(21) 【出願番号】

特願平 10-270370

(21)[APPLICATIONNUMBER]

Japanese Patent Application No. 10-270370

(22) 【出願日】

平成 10 年 9 月 24 日 (1998. 9. 24)

(22)[DATEOFFILING]

September 24, Heisei 10 (1998. 9.24)

(71) 【出願人】

(71)[PATENTEE/ASSIGNEE]

【識別番号】

000004189

[IDCODE]

000004189

【氏名又は名称】

日本水産株式会社

Nippon Suisan, K.K.

【住所又は居所】

東京都千代田区大手町 2 丁目 6 番 2 号

[ADDRESS]

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 山田 彰一

Shoichi Yamada

【住所又は居所】

八王子市北野町 559-6 日本水産株式会社中央研究所内

[ADDRESS]

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 大橋 英治

Eiji Ohashi

【住所又は居所】

八王子市北野町 559-6 日本水産株式会社中央研究所内

[ADDRESS]

(74) 【代理人】

(74)[PATENTAGENT]

【識別番号】

100102314

[IDCODE]

100102314

【弁理士】

[PATENT ATTORNEY]

【氏名又は名称】

須藤 阿佐子

Asako Sudo

【テーマコード (参考)】

4B063

[Theme code (reference)]

4B063

【Fターム (参考)】

4B063 QA01 QA18 QQ06  
QQ35 QR07 QR41 QR42  
QR66 QS20 QX02

[F term (reference)]

4B063QA01QA18QQ06QQ35QR07QR41QR4  
2QR66QS20QX02

(57) 【要約】

(57) [SUMMARY]

【課題】

食品中の大腸菌群の有無を、必要によりその数を迅速に正確に判定する方法を提供すること。

[SUBJECT]

Provides the method of judging the existence and number if necessary of the coliform group in foodstuffs accurately and rapidly.

【解決手段】

大腸菌群を該 $\beta$ ガラクトシダーゼを指標に検出する方法であって、検体または該検体を一定量含む被検液を、大腸菌群特異的酵素である $\beta$ ガラクトシダーゼの生成量が増大するように培養し、該 $\beta$ ガラクトシダーゼの酵素活性を測定する。 $\beta$ ガラクトシダーゼの生成量を増大させるため、アデノシン3', 5' サイクリックリン酸(cAMP) および/またはヘキソキナーゼの存在下で培養する。イソプロピルー $\beta$ -D-チオガラクトピラノサイド(IPTG)の存在下で培養する、および/または(5)基質として $\beta$ ガラクトシダーゼの感度の良い蛍光基質、好ましくは4-メチルウンベリフェリルー $\beta$ -D-ガラクトシ

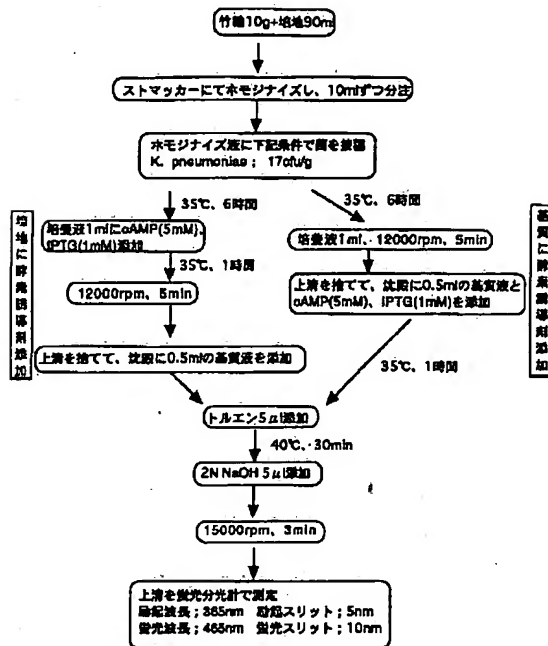
[SOLUTION]

It is the method of detecting this (beta) galactosidase against a parameter for a coliform group, comprised such that it cultivates the test substance or test liquid containing a constant-rate of this test substance so that the generation amount of the (beta) galactosidase which is a coliform-group specific enzyme increases, and the enzyme activity of this (beta) galactosidase is measured.

In order to increase the generation amount of (beta) galactosidase, it cultivates in the presence of adenosine 3', 5' cyclic-phosphoric acid (cAMP), and/or the hexokinase.

It cultivates in the presence of an isopropyl-(beta)-D-thio galacto pyranoside (IPTG), and/or it is a fluorescent substrate with the sufficient response of a galactosidase as a (5) substrate (beta), and it is desirable to use together with the process preferably cultivated using a 4-methyl umbelliferyl-(beta)-D-galactoside.

ドを用いて培養する工程と併用  
することが好ましい。



Paste cakes 10g + culture medium of Chikuwa (tube-shaped fish cakes),  
homogenize with a Stomacher, dispense 10ml at a time,  
inoculate microbe into the homogenization liquid on the following conditions,  
Left :  
add enzyme-induction-agent-to the culture medium,  
6 hours,  
add cAMP (5 mM), IPTG(1 mM) to 1ml of culture solutions,  
Right,  
Add enzyme-induction-agent to the substrate,  
1ml of culture solutions, 12000 rpm, 5 minutes,  
Discard supernatant liquid, add 0.5ml culture solution, and cAMP (5 mM), IPTG,  
(1 mM) to precipitate,  
Add 5 micro liters toluene,  
40 degrees Celsius, 30 min,  
Add 2N NaoH 5 microliters,  
15000 rpm; 3 min,

Measure supernatant liquid with fluorescent spectrometer.

Excitation wavelength; 365nm Excitation slit; 5nm,

Fluorescent wavelength: 465nm Fluorescent slit; 10nm

**【特許請求の範囲】****[CLAIMS]****【請求項 1】**

大腸菌群を該  $\beta$  ガラクトシダーゼを指標に検出する方法であつて、検体または該検体を一定量含む被検液を、大腸菌群特異的酵素である  $\beta$  ガラクトシダーゼの生成量が増大するように培養し、該  $\beta$  ガラクトシダーゼの酵素活性を測定することを特徴とする大腸菌群の迅速検出法。

**[CLAIM 1]**

A rapid detection method of the coliform group, which is the method of detecting this (beta) galactosidase against a parameter for a coliform group, comprised such that it cultivates the test substance or test liquid containing a constant-rate of this test substance so that the generation amount of the (beta) galactosidase which is a coliform-group specific enzyme increases, and the enzyme activity of this (beta) galactosidase is measured.

**【請求項 2】**

アデノシン 3', 5' サイクリックリン酸 (cAMP) および/またはグルコースを除去するための酵素の存在下で培養する請求項 1 の大腸菌群の迅速検出法。

**[CLAIM 2]**

The rapid detection method of the coliform group of Claim 1 cultivated in the presence of the enzyme for removing adenosine 3', 5' cyclic-phosphoric acid (cAMP), and/or a glucose.

**【請求項 3】**

グルコースを除去するための酵素がヘキソキナーゼである請求項 2 の大腸菌群の迅速検出法。

**[CLAIM 3]**

The rapid detection method of the coliform group of Claim 2 whose enzyme for removing a glucose is the hexokinase.

**【発明の詳細な説明】****[DETAILED DESCRIPTION OF INVENTION]****【0001】****[0001]****【産業の属する技術分野】**

本発明は、大腸菌群の迅速検出法に関する。

**[The technical field which industry belongs]**

This invention relates to the rapid detection method of a coliform group.

**【0002】****[0002]**

**【従来の技術】**

大腸菌群はBGLB培地において、酸とガスを生成する菌である。この酸やガスを測定する方法によると培養に48時間かかる。しかし、チルド流通している日配品のような比較的賞味期限の短い製品の場合、検査結果が出る前に製品は出荷されており、製品の安全性を確認することができず、その安全が危惧される。そのため迅速に大腸菌群を測定する方法が切望されている。大腸菌群を迅速に検出するには、大腸菌群特異的酵素であるβガラクトシダーゼの酵素活性を測定する方法、培養中の培地のインピーダンス変化を感知する方法、消費酸素や発生する二酸化炭素を測定する方法、菌体内のATPを利用して発光させる方法、PCRによる遺伝子増幅などが考えられる。しかし、大腸菌群の検出時間を8時間以内とした場合、いずれの方法も、検出系が確立されていないものか、確立されていてもこの時間内では十分な感度を得られていないものであるというのが現状である。

**【0003】****【発明が解決しようとする課題】**

本発明は食品中の大腸菌群の有無を、必要によりその数を迅速に正確に判定する方法を提供することを目的としている。

**[PRIOR ART]**

A coliform group is set to a BGLB culture medium, they are an acid and the microbe which generates gas.

According to the method of measuring this acid and gas, a culture takes 48 hours.

However, in the case of a product with a comparatively short use-by date like chilled Japanese perishable delivered good which are circulating, before an inspection result comes out, it carries away the product, the safety of a product cannot be checked but it is apprehensive about the safety.

Therefore, it is anxious for the method of measuring a coliform group rapidly.

In order to detect a coliform group rapidly, the gene amplification by the method of measuring the enzyme activity of the galactosidase which is a coliform-group specific enzyme (beta), the method of sensing impedance change of the culture medium under culture, the method of measuring consumption oxygen and the generated carbon dioxide, the method of light-emitting using ATP in a microbial cell, and PCR etc. can be considered.

However, when detection time of a coliform group is made into less than 8 hours, the present condition is whether the detection system's being established also for the any method, and being at this point in that from which response sufficient within between is not obtained, even if established.

**[0003]****[PROBLEM ADDRESSED]**

This invention aims at providing the method of judging the number for the existence of the coliform group in foodstuffs correctly rapidly if necessary.

【0004】

**【課題を解決するための手段】**

対象物に大腸菌群が存在することを調べるにあたり、大腸菌群の特異的酵素βガラクトシダーゼを指標にする。そのβガラクトシダーゼの生成量を増大させてからその酵素活性を測定する。すなわち、本発明は、大腸菌群を該βガラクトシダーゼを指標に検出する方法であって、検体または該検体を一定量含む被検液を、大腸菌群特異的酵素であるβガラクトシダーゼの生成量が増大するように培養し、該βガラクトシダーゼの酵素活性を測定することを特徴とする大腸菌群の迅速検出法を要旨としている。上記のβガラクトシダーゼの生成量が増大するように培養する手段として、以下の(a)および/または(b)手段が本出願前周知である。

(a) イソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノサイド (IPTG) の存在下で培養する。

(b) 基質としてβガラクトシダーゼの感度の良い蛍光基質を用いて培養する。該蛍光基質として、好ましくは4-メチルウンベリフェリルーβ-D-ガラクトシドを用いる。

【0005】

本発明は、βガラクトシダーゼの生成量が増大するように培養する手段が、以下の(1)および/または(2)の手段であることを特徴としている。

[0004]

**[SOLUTION OF THE INVENTION]**

It is as follows in order to investigate that a coliform group exists in an object.

The specific enzyme (beta) galactosidase of a coliform group is made into a parameter.

Since the generation amount of the (beta) galactosidase is increased, the enzyme activity is measured.

That is, this invention is the method of detecting this (beta) galactosidase against a parameter for a coliform group, comprised such that a test substance or test liquid containing this test substance is cultivated so that the generation amount of the galactosidase which is a coliform-group specific enzyme (beta) may increase at a constant-rate, and

The enzyme activity of this (beta) galactosidase is measured.

The rapid detection method of the coliform group characterized by the above-mentioned is made into the summary.

As means to cultivate so that the generation amount of said (beta) galactosidase may increase, the following (a) and/or (b) means are known before this application.

(a) Cultivating in the presence of an isopropyl-(beta)-D-thio galacto pyrano side (IPTG).

(b) Cultivating using a fluorescent substrate with the sufficient response of a galactosidase as a substrate (beta).

As this fluorescent substrate, preferably a 4-methyl umbelliferyl-(beta)-D-galactoside is used.

[0005]

This invention is characterized by means to cultivate so that the generation amount of a galactosidase (beta) may increase being the following (1) and/or means of (2).

(1)

It cultivates in the presence of adenosine 3' and

(1) アデノシン 3' , 5' サイクリックリン酸 (cAMP) の存在下で培養する。

(2) グルコースを除去するための酵素の存在下で培養する。上記のグルコースを除去するための酵素の好ましい例として、ヘキソキナーゼを挙げることができる。

**[0006]**

したがって、本発明の大腸菌群の迅速検出法は、大腸菌群を該  $\beta$  ガラクトシダーゼを指標に検出する方法であって、検体または該検体を一定量含む被検液を、以下に示した (a) の手段、(b) の手段、ならびに、(1) および/または (2) の手段で大腸菌群特異的酵素である  $\beta$  ガラクトシダーゼの生成量が増大するように培養し、該  $\beta$  ガラクトシダーゼの酵素活性を測定する態様を包含している。

(a) イソプロピルー  $\beta$ -D-チオガラクトピラノサイド (IPTG) の存在下で培養する。

(b) 基質として  $\beta$  ガラクトシダーゼの感度の良い蛍光基質を用いて培養する。該蛍光基質として、好ましくは 4-メチルウンベリフェリルー  $\beta$ -D-ガラクトシドを用いる。

(1) アデノシン 3' , 5' サイクリックリン酸 (cAMP) および/または (2) グルコースを除去するための酵素の存在下で培養する。

**[0007]**

5' cyclic-phosphoric acid (cAMP).

(2)

It cultivates in the presence of the enzyme for removing a glucose.

The hexokinase can be mentioned as a desirable example of the enzyme for removing said glucose.

**[0006]**

Therefore, the rapid detection method of the coliform group of this invention is a method of detecting this (beta) galactosidase against a parameter for a coliform group.

Comprising:

It cultivates so that the generation amount of the galactosidase which is a coliform-group specific enzyme (beta) may increase test substance or a test liquid which contains a constant rate for this test substance by means (a), means (b) and means (1) and/or (2) shown below, and the aspect which measures the enzyme activity of this (beta) galactosidase is included.

(a) Cultivating in the presence of an isopropyl-(beta)-D-thio galactopyranoside (IPTG).

(b) Cultivating using a fluorescent substrate with the sufficient response of a galactosidase as a substrate (beta).

As this fluorescent substrate,

Preferably a 4-methyl umbelliferyl-(beta)-D-galactoside is used.

(1)

It cultivates in the presence of the enzyme for removing adenosine 3', 5' cyclic-phosphoric acid (cAMP), and/or a (2) glucose.

**[0007]**



### 【発明の実施の形態】

本発明の大腸菌群の迅速検出法において、検体または該検体を一定量含む被検液を、大腸菌群特異的酵素である $\beta$ ガラクトシダーゼの生成量が増大するように培養するとき、例えば基質として $\beta$ ガラクトシダーゼの感度の良い蛍光基質、好ましくは4-メチルウンベリフェリル $\beta$ -D-ガラクトシドを用いる。 $\beta$ ガラクトシダーゼの生成量をあげるために、イソプロピル $\beta$ -D-チオガラクトピラノサイド (IPTG) を使用する。さらに $\beta$ ガラクトシダーゼの生成量をあげるために、アデノシン3'、5' サイクリックリン酸 (cAMP) および/または反応液中のグルコースを除去するための酵素、好ましくはヘキソキナーゼを使用する。グルコースを除去するための酵素としては、他にグルコースオキシダーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼ等が挙げられる。

### 【0008】

食品中の大腸菌群の有無を8時間以内で判定するため、大腸菌群特異的酵素である $\beta$ ガラクトシダーゼの酵素活性を指標とした。 $\beta$ ガラクトシダーゼの基質として種々の合成誘導体が知られているが、最も感度がよいとされている蛍光基質、なかでも蛍光強度が強い4-メチルウンベリフェリル $\beta$ -D-ガラクトシドを用いた。この基質を用いた方法 (特公昭58-17598号) は存在するが、その方法では食品1g中に1cfuと

### 【Emb dim nt】

In the rapid detection method of the coliform group of this invention, when cultivating a test substance or test liquid that contains a constant-rate of this test substance so that the generation amount of the galactosidase which is a coliform-group specific enzyme (beta) may increase, for example, a fluorescent substrate with the sufficient response of a galactosidase as a substrate (beta), preferably a 4-methyl umbelliferyl-(beta)-D-galactoside is used.

Since the generation amount of a (beta) galactosidase is mentioned, an isopropyl-(beta)-D-thio galacto pyrano side (IPTG) is used.

The enzyme for removing the glucose in adenosine 3', 5' cyclic-phosphoric acid (cAMP), and/or a reaction liquid, since the generation amount of a galactosidase is further (beta) mentioned, preferably the hexokinase is used.

As an enzyme for removing a glucose, the glucose oxidase, the glucose dehydrogenase, etc. are mentioned to others.

### 【0008】

In order to judge the existence of the coliform group in foodstuffs within 8 hours, the enzyme activity of the galactosidase which is a coliform-group specific enzyme (beta) was made into the parameter.

Various synthetic derivatives as a substrate of a (beta) galactosidase are known.

However, fluorescent substrates that are made the most highly sensitive, among them 4-methyl umbelliferyl-(beta)-D-galactoside. with a strong fluorescence intensity), are used.

The method (Examined Japanese Patent No. 58-17598) using this substrate exists.

However, by this method.

When only a very small amount of 1cfu coliform group exists in 1g in foodstuffs, detection of

いったごく少量の大腸菌群しか存在しない場合、8時間以内の検出は困難である。

less than 8 hours is difficult.

**[0009]**

そのため、大腸菌群のβガラクトシダーゼ生成量を増大させることで検出感度を上げることを試みた。既に上記方法にも示されているイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノサイド (IPTG) とアデノシン3'、5' サイクリックリン酸 (cAMP) とヘキソキナーゼを添加することによって、相乗的にβガラクトシダーゼの生成量を増大することができた。ヘキソキナーゼの添加効果についてはまだ報告がされていない。

**[0009]**

Therefore, it tried to raise a detection response by increasing the galactosidase (beta) generation amount of a coliform group.

The generation amount of a galactosidase was able to be increased multiplicatively (beta) by adding the isopropyl-(beta)-D-thio galactopyrano side (IPTG), adenosine 3' and 5' cyclic-phosphoric acid (cAMP), and the hexokinase which are already shown by said method.

About the addition effect of the hexokinase, the report is not carried out yet.

**[0010]**

本発明の検出法が対象とする大腸菌群：グラム陰性の桿菌で乳糖を分解し酸とガスを産生する微生物であり、例えば、エシェリア属、サイトロバクター属、クレブシエラ属、エンテロバクター属等があげられる。

使用する培地：大腸菌群のみが増殖できる何らかの選択圧をかけた培地が好ましい。

酵素誘導剤の添加量：IPTG 0.1 mM～10 mM、cAMP 0.1 mM～100 mM、ヘキソキナーゼ 0.01 U～5 U

**[0010]**

Coliform group which the detection method of this invention makes an object :

With a Gram negative Bacillus, they are the microorganisms which degrade lactose and produce an acid and gas.

For example, it mentions the Escherichia genus, the Citrobacter genus, the Klebsiella genus, the Enterobacter, etc.

Culture medium which uses :

The culture medium to which a certain selection pressure which can propagate only a coliform group was applied is desirable.

The additional amount of an enzyme-induction agent: IPTG 0.1 mM - 10 mM, cAMP 0.1 mM - 100 mM, hexokinase 0.01U-5U

**[0011]**

感度の良い蛍光基質：4-メチルウンベリフェリルーβ-D-ガラクトシド、3-カルボキシ-ウンベリフェリルーβ-D-

**[0011]**

Highly sensitive fluorescent substrate :

4-methyl umbelliferyl-(beta)-D-galactoside, 3-carboxy-umbelliferyl-(beta)-D-galactoside, fluorescein-di-(beta)-D-galactoside,

ガラクトシド、フルオレジン-  
ダイ-β-D-ガラクトシド、  
C<sub>12</sub>-フルオレジン-ダイ-β  
-D-ガラクトシド

**【0012】****【作用】**

本発明ではIPTG、cAMP、  
ヘキソキナーゼの添加によって  
大腸菌群のβガラクトシダーゼ  
の生成量を増大させることがで  
き、8時間での検出が可能とな  
る。それぞれの役割はIPTG  
がβガラクトシダーゼ遺伝子の  
転写をONにし、cAMPは転  
写因子と結合してその転写を促  
進する。ヘキソナーゼはグルコ  
ースをグルコース-6-リン酸  
にする酵素である。グルコース  
が存在するとβガラクトシダー  
ゼの生成が阻害されるため、反  
応液中からグルコースをなくす  
ために添加する。

**【0013】****【実施例】**

本願発明の詳細を実施例で説明  
する。本願発明はこれら実施例  
によって何ら限定されるもので  
はない。

**【0014】****実施例1**

代表的な大腸菌群である大腸菌  
とクレブシエラ ニューモニア  
(*Klebsiellapneumoniae*) を用  
いて、β-ガラクトシダーゼ生  
成量に影響を及ぼすcAMP、

**【EFFECT】**

In this invention, by addition of IPTG, cAMP, and the hexokinase, the generation amount of the galactosidase (beta) of a coliform group can be increased, and a detection can be performed in 8 hours.

As for each role, IPTG turns ON the transfer of a galactosidase (beta) gene, cAMP connects with a transcription factor and promotes the transfer.

The hexokinase is an enzyme which makes glucose become glucose-6-phosphate.

Since it will obstruct generation of a galactosidase if a glucose exists (beta), it adds in order to eliminate a glucose out of a reaction liquid.

**【Example】**

An Example demonstrates the detail of this invention.

This invention is not limited at all by these Examples.

**[0014]****Example 1**

The *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* which are a typical coliform group are used, cAMP and IPTG which affect a (beta)-galactosidase generation amount, the synergistic effect of the hexokinase, and examination about the influence by the addition stage.

IPTG、ヘキソキナーゼの相乗効果およびその添加時期による影響についての検討。

1) 使用した培地

ポリペプトン  
15 g (培地 1 リットルあたり)

NaCl

5 g

酵母エキス

5 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2.5 g

SDS

0.1 g

KNO<sub>3</sub>

1 g

ピルビン酸ナトリウム

1 g

2) 基質液

12.5 mg 4-メチルウンベリフェリル-β-D-ガラクトシド / 50 ml H<sub>2</sub>O を加熱溶解後、0.5 M Tris-HCl (pH 9.0) を 0.4 ml 加え、陰イオン交換カラムを通し HCl で pH を 7.2 に調整後 0.45 μm のフィルターでろ過。この液を 9 に対して 1 の割合で 0.5 M の PIPES (pH 7.2) を加え基質液とする。

3) 蛍光値の陽性、陰性の判定  
菌が存在していないときの蛍光値は 10-15、蛍光値が 20 以上であったとき陽性とした。20 未満のときには陰性とした。

[0015]

実験 1: cAMP、IPTG、ヘキソキナーゼの添加効果

図 1 に示す手順で、竹輪 10 g と培地 90 ml をストマッカー

1) Culture medium which used

Polypeptone 15g (per 1 liter of culture mediums)

NaCl 5g

Yeast extract 5g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.5g

SDS 0.1g

KNO<sub>3</sub> 1g

Sodium pyruvate 1g

2) Substrate liquid

12.5 mg 4-methyl umbelliferyl-(beta)-D-galactoside / 50 ml H<sub>2</sub>O after heating-dissolution, 0.4 ml (pH 9.0) of 0.5 M Tris-HCl is added, it lets an anion exchange column pass and after adjusting pH to 7.2, is at HCl.

It filtered with the 0.45-micrometer filter.

PIPES (pH 7.2) of 0.5 M is added at a ratio of 1 to 9, and this liquid is made to be a substrate liquid.

3) A fluorescent value when the evaluation microbe of a positive, negative fluorescent value does not exist, when 10-15 and a fluorescent value were 20 or more, it was presupposed that it is positive.

At the time less than of 20, it considered as negative.

[0015]

Experiment 1: cAMP, IPTG, the addition effect of the hexokinase

In the procedure shown in FIG. 1, 10g of Chikuwa (tube-shaped fish paste cake)s and 90

にてホモジナイズし、10 ml ずつ分注し、該ホモジナイズ液に菌（大腸菌 12 cfu/g、K. pneumoniae 22 cfu/g）を接種し、35℃、6時間培養する。培養液を12000 rpmで5分間遠心分離して上清を捨て、沈殿に5 mlの基質液を添加し、よく攪拌後、0.5 ml ずつ分注し、各々の酵素誘導剤を添加し、35℃、1時間反応を行い、さらにトルエン 5  $\mu$ l を添加し、40℃、30分間反応を行った。この反応液に2NのNaOH 5  $\mu$ l を添加し、12000 rpmで5分間遠心分離してから、365 nmの励起波長、5 nmの励起スリットで紫外線を照射して励起させ、465 nmの蛍光波長、10 nmの蛍光スリットの蛍光を蛍光分光計で測定する。大腸菌を添加した場合の結果を表1に、Klebsiella pneumoniae を添加した場合の結果を表2に、それぞれ示す。

ml of culture mediums are homogenized with a Stomacher, it dispenses 10 ml at a time, a microbe (Escherichia coli 12 cfu/g, Kpneumoniae 22 cfu/g) is vaccinated into this homogenization liquid, it cultivates 35 degrees-Celsius for 6 hours.

A culture solution is centrifuged for 5 minutes by 12000 rpm, a supernatant liquid is thrown away, and a 5 ml substrate liquid is added to a precipitate, it often dispenses 0.5 ml at a time after stirring, each enzyme-induction agent is added, 35 degrees-Celsius and a 1-hour reaction are performed, and toluene 5 microliter is further added, the reaction was performed for 40 degrees-Celsius and 30 minutes.

2-N NaOH 5 microliter is added to this reaction liquid, after centrifuging for 5 minutes by 12000 rpm, ultraviolet radiation is irradiated and excited by the excitation wavelength of 365 nm, and the 5 nm excitation slit.

Fluorescence of fluorescent wavelength of 465 nm and a fluorescent slit of 10 nm is measured with a fluorescent spectrometer.

In Table 1, the result at the time of adding an Escherichia coli, and in Table 2, the result at the time of adding Klebsiella pneumoniae, are shown, respectively.

【0016】

[0016]

【表1】

[Table 1]

大腸菌を添加した場合				When an Escherichia coli is added
				CAMP (5mM), IPTG, (1mM) Hexokinase(0.3U), Fluorescent value
			-	12
			+	12
			-	220
cAMP	IPTG		+	11
ヘキソキナーゼ			+	655
5 mM	1 mM		+	319
			+	21

0. 3 U	蛍光値	+	+	+	440
<hr/>					
<hr/>					
<hr/>					
-	-	-	-	-	-
-	1 2	-	-	-	-
+	1 2	-	-	-	-
-	2 2 0	+	-	-	-
+	1 1	-	-	-	-
+	6 5 5	+	-	-	-
-	3 1 9	+	-	-	-
+	2 1	-	-	-	-
+	4 4 0	+	-	-	-
<hr/>					
<hr/>					
<hr/>					

【0017】

[0017]

【表2】

[Table 2]

K .pneumonia				When K. pneumoniae is added
e を添加した場合				CAMP(10mM)   IPTG(1mM)  Hexokinase0.3U
				Fluorescent value
<hr/>				<hr/>
<hr/>				<hr/>
c AMP	I P T G			12
へキソキナーゼ				13
1 0 mM	1 mM			16
0. 3 U	蛍光値			12
<hr/>				<hr/>
<hr/>				<hr/>
<hr/>				<hr/>
-	-	-	-	22
+	-	-	-	19
-	+	-	-	13
+	+	+	+	31
<hr/>				<hr/>
<hr/>				<hr/>

—	—	—
—	—	1 2
—	+	—
—	—	1 3
—	—	+
—	—	1 6
—	—	—
+	—	1 2
—	+	+
—	—	2 2
—	—	+
+	—	1 9
—	+	—
+	—	1 3
—	+	+
+	—	3 1

### 【0018】

実験2：cAMP、IPTGの  
添加時期

図2に示すとおり、竹輪10g  
と培地90mlをストマッカー  
にてホモジナイズし、10ml  
ずつ分注し、該ホモジナイズ液  
に菌（*K. pneumoniae* 17 cfu/g）を接種し、  
35℃、6時間培養する。一方  
の培養液1mlを12000rpmで5分間遠心分離して上清  
を捨てて、沈殿に0.5mlの  
基質液とcAMP（5mM）、I  
PTG（1mM）を添加し、他  
方の培養液1mlにcAMP  
（5mM）、IPTG（1mM）  
を添加し、35℃、1時間培養  
してから12000rpmで5  
分間遠心分離して上清を捨て  
て、沈殿に0.5mlの基質液

### 【0018】

Experiment 2: cAMP, addition stage of IPTG  
10g of Chikuwa (tube-shaped fish paste cake)s  
and 90 ml of culture mediums are homogenized  
with a Stomacher as shown in FIG. 2, it  
dispenses 10 ml at a time, a microbe (*K.  
pneumoniae* 17 cfu/g) is inoculated into this  
homogenization liquid, it cultivates 35 degrees-  
Celsius for 6 hours.

1 ml of one culture solutions is centrifuged for 5  
minutes by 12000 rpm, a supernatant liquid is  
thrown away, and a 0.5 ml substrate liquid,  
cAMP (5 mM), and IPTG (1 mM) are added to a  
precipitate, cAMP (5 mM) and IPTG (1 mM) are  
added to 1 ml of culture solutions of another  
side, it centrifuges for 5 minutes after cultivating  
for 1 hour by 12000 rpm 35 degrees-Celsius, a  
supernatant liquid is thrown away, and a 0.5 ml  
substrate liquid is added to a precipitate, both  
add 5 microliters of toluene, respectively, the  
reaction was performed for 40 degrees-Celsius  
and 30 minutes.

2-N. NaOH 5 microliter is added to each of this  
reaction liquid, after centrifuging for 3 minutes

を添加し、両者ともそれぞれトルエン  $5 \mu\text{l}$  を添加し、 $40^\circ\text{C}$ 、30分間反応を行った。この反応液それぞれに2NのNaOH  $5 \mu\text{l}$  を添加し、15000 rpmで3分間遠心分離してから、365 nmの励起波長、5 nmの励起スリットで紫外線を照射して励起させ、465 nmの蛍光波長、10 nmの蛍光スリットの蛍光を蛍光分光計で測定する。結果を表3に示す。

【0019】

【表3】

初発 (cfu/g)、蛍光値 (培地に酵素誘導剤添加)、  
 蛍光値 (基質に酵素誘導剤添加)

Klebsiella pneumoniae	1
7	1 5
3 2	

【0020】

結果

表1、表2より大腸菌、クレブシエラニューモニアにおいてcAMP、IPTG、ヘキソキナーゼの併用効果が確認された。また、表3よりこれらの酵素誘導剤は基質液に直接添加す

by 15000 rpm, ultraviolet radiation is irradiated and excited by the excitation wavelength of 365 nm, and the 5 nm excitation slit.

The fluorescence of a fluorescent slit (the fluorescent wavelength of 465 nm and 10 nm) is measured with a fluorescent spectrometer.

A result is shown in Table 3.

[0019]

[Table 3]

Initial (cfu/g) , fluorescent value (enzyme-induction agent addition to a culture medium)  
 Fluorescent value (enzyme-induction agent addition to a substrate)

Klebsiella pneumoniae	17	15	32
-----------------------	----	----	----

[0020]

Result

They are an Escherichia coli and a Klebsiella from Table 1 and Table 2. In the pneumoniae, cAMP, IPTG, and the combined use effect of the hexokinase were checked. Moreover, it was shown from Table 3 that it is more desirable to add these enzyme-induction agents directly to a substrate liquid.



る方が好ましいことが示された。

### 【0021】

#### 実施例 2

図3に示す手順で、大腸菌、Klebsiella pneumoniae を竹輪破砕物に加え、蛍光値を測定する。酵素誘導剤の添加量は、大腸菌の場合、cAMP 10 mM、IPTG 1 mM、ヘキソキナーゼ 2 Uであり、K.pneumoniae の場合、cAMP 10 mM、IPTG 1 mM、ヘキソキナーゼ 0.2 Uである。結果を表4に示す。

### [0021]

#### Example 2

In the procedure shown in FIG. 3, an Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae are added to a Chikuwa (tube-shaped-fish-paste-cake) crushed material, and a fluorescent value is measured.

In the case of an Escherichia coli, the additional amount of an enzyme-induction agent is cAMP 10 mM, IPTG 1 mM, and hexokinase 2U. In K. pneumoniae, it is cAMP 10 mM, IPTG 1 mM, and hexokinase 0.2U.

A result is shown in Table 4.

### 【0022】

### [0022]

【表4】

(cfu/g)	初 発 蛍光値
大腸菌	1
27	0
506	
K.pneumoniae	2
25	0
167	

[Table 4]

Initial (cfu/g)	Fluorescent value
Escherichia coli	1
27	
10	506
K.pneumoniae	2
25	
20	167

## 【0023】

## 実施例 3

図3に示す手順で、種々の大腸菌群を竹輪破碎物に加え、蛍光値を測定する。対象菌は日本で市販されている大腸菌群を用いた。結果を表5に示す。

## [0023]

## Example 3

In the procedure shown in FIG. 3, various coliform group is added to a Chikuwa(tube-shaped-fish-paste-cake) crushed material, and a fluorescent value is measured.

The object microbe used the coliform group marketed in Japan.

A result is shown in Table 5.

## 【0024】

## [0024]

## 【表5】

## [Table 5]

初発 (c f u / g)		蛍光値		酵素誘導剤の条件		Initial(cfu/g), Fluorescence value, Conditions of an enzyme-induction agent		
Citrobacter		freundii				Citrobacter freundii IFO12681		7 66 2
IFO12681		7		66		Enterobacter arugenes IFO13534		2 21 1
Enterobacter		arugenes				Enterobacter gergoviae JCM1234		851 2 1
JCM1234		1		851		Enterobacter intermedium JCM1238		22 2 1
Enterobacter		intermedium				Citrobacter diversus JCM1659		50 2 1
JCM1659		1		50		Budvicia aquatica JCM3902		779 1 1
Budvicia		aquatica				Ewingella amerricana JCM5911		51 2 1
JCM3902		1		779		Citrobacter amalonaticus IFO13547		360 2 2
Ewingella		amerricana				Enterobacter sakazakii JCM1233		614 2 1
JCM5911		1		51		Klebsiella oxytoca JCM1665		100 2 2
Citrobacter		amalonaticus				Leclercia adecarboxylate JCM1667		265 2 1
						Klebsiella terrigena JCM1687		24 1 1
						Escherichia vulneris JCM1688		40 2 1
						Klebsiella ornithinolytica JCM6096		25 2 1

IFO13547	2	360	Conditions of an enzyme-induction agent : 1: cAMP 10 mM, IPTG 1 mM, hexokinase 2U 2: cAMP 10 mM, IPTG 1 mM, hexokinase 0.2U
2			
Enterobacter		sakazakii	
JCM1233	1	614	
2			
Klebsiella		oxytoca	
JCM1665	2	100	
2			
Leclercia		adecarboxylate	
JCM1667	1	265	
2			
Klebsiella		terrigena	
JCM1687	1	24	
1			
Escherichia		vulneris	
JCM1688	1	40	
2			
Klebsiella		ornithinolytica	
JCM6096	1	25	
2			

## 酵素誘導剤の条件：

1 : cAMP 10 mM、IPTG 1 mM、ヘキソキナーゼ 2 U  
 2 : cAMP 10 mM、IPTG 1 mM、ヘキソキナーゼ 0.2 U

[0025]

## 【発明の効果】

食品中の大腸菌群の有無を、必要によりその数を迅速に正確に判定することができる。8時間での検出が可能となり、チルド流通している日配品のような比較的賞味期限の短い製品の大腸菌などの早期発見と早期対応等が可能となる。

## 【図面の簡単な説明】

[0025]

## [EFFECT OF THE INVENTION]

The number can be rapidly judged for the existence of the coliform group in foodstuffs correctly if necessary.

A detection in 8 hours is attained, early detection, such as an Escherichia coli of a product with a comparatively short use-by date like chilled Japanese perishable deliverable goods which are circulating, early correspondence, etc. can be performed.

## [BRIEF EXPLANATION OF DRAWINGS]

**【図 1】**

酵素誘導剤を添加して培養した後で $\beta$ -ガラクトシダーゼの酵素活性を測定する操作手順を説明する工程図である。

**[FIG.1]**

After adding and cultivating an enzyme-induction agent, it is flowchart explaining the operating procedure which measures the enzyme activity of a (beta)-galactosidase.

**【図 2】**

図 1 における *K.pneumoniae* を用いる場合の酵素誘導剤の添加の順序を変えたときの工程図である。

**[FIG.2]**

It is flowchart when changing the order of addition of the enzyme-induction agent in the case of using *Kpneumoniae* in FIG. 1.

**【図 3】**

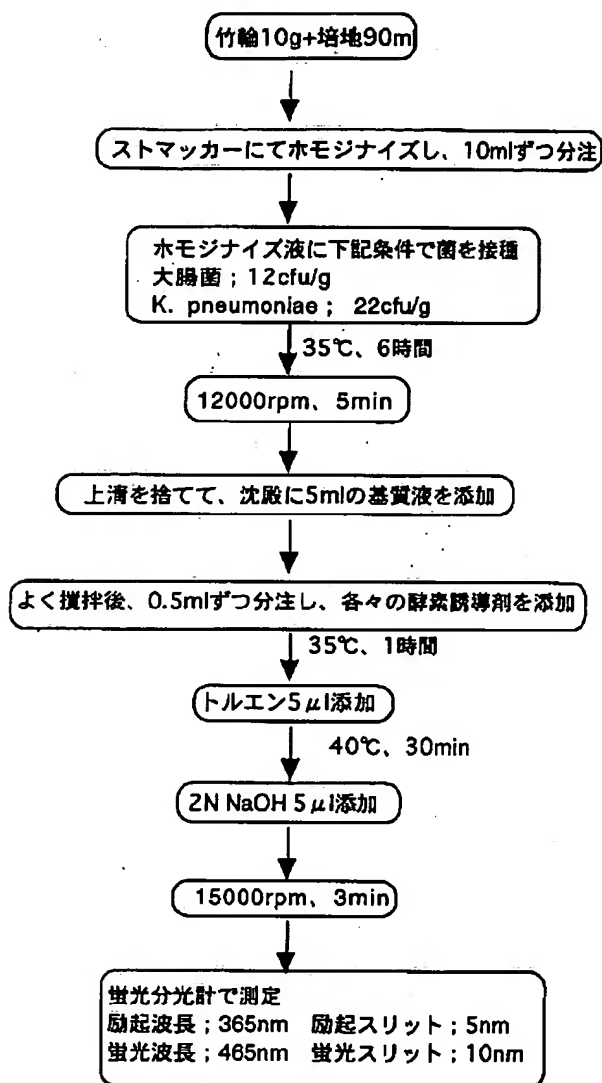
大腸菌、*K. lebsiella pneumoniae* および種々の大腸菌群を竹輪破碎物に加え、蛍光値を測定するときの操作手順を説明する工程図である。

**[FIG.3]**

It is a flowchart explaining the operating procedure when adding an *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and various coliform groups to a Chikuwa (tube-shaped-fish-paste-cake) crushed material, and measuring a fluorescent value.

**【図 1】**

**[FIG.1]**

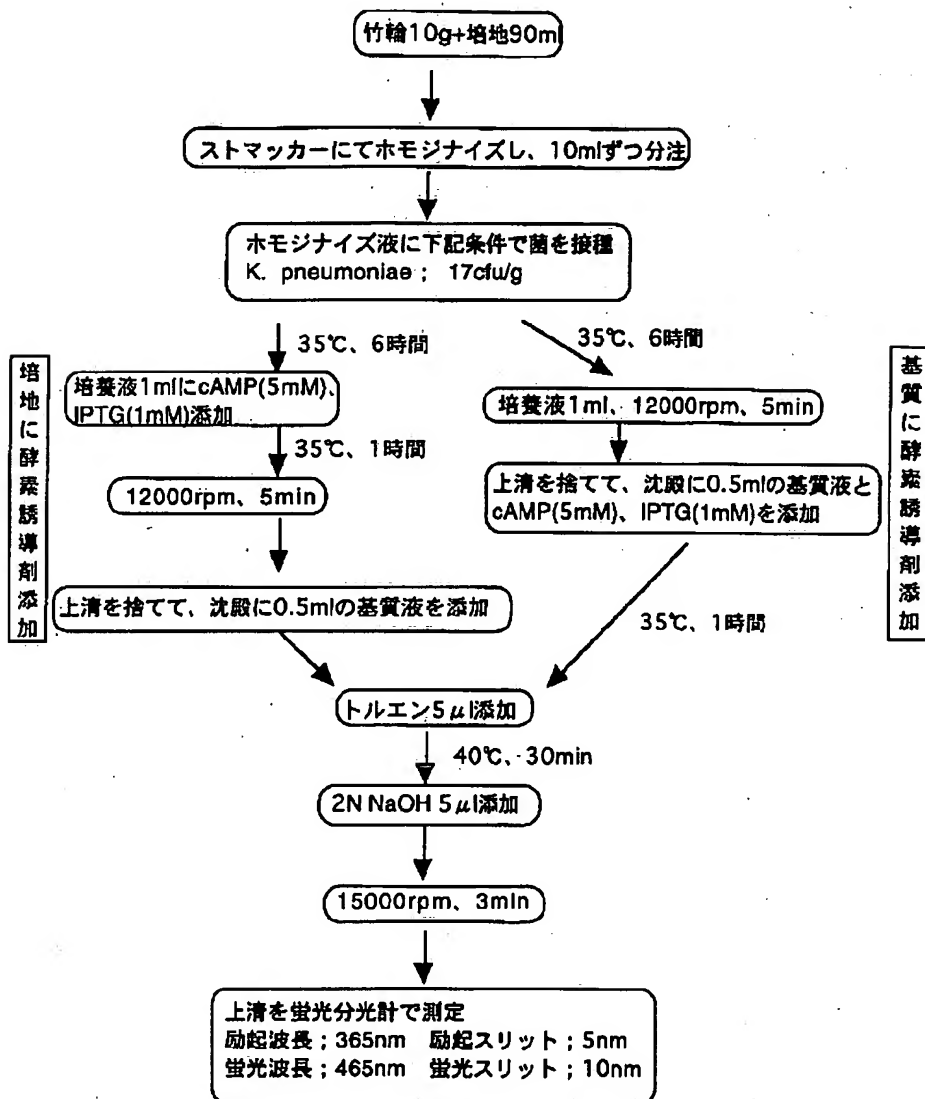


Chikuwa 10g + culture medium,  
 Homogenize in a stomacher, dispense 10 ml at a time,  
 Inoculate microbe into homogenizer liquid under the following conditions  
 Coliform bacteria; 12 cfu/g  
 K. pneumoniae; 22 cfu/g  
 35 degrees Celsius, 6 hours,  
 12000 rpm, 5 min  
 discard supernatant liquid, add 5 ml culture solution to precipitate,  
 After mixing well, discard 0.5 ml at a time and add each enzyme-induction-agent,  
 35 degrees Celsius, 1 hour,  
 add 5 microliters toluene,

40 degrees Celsius, 30 min  
 add microliters 2N NaOH 5,  
 15000 rpm, 3 min;  
 measure supernatant liquid with fluorescent spectrometer  
 Excitation wavelength; 365nm Excitation slit; 5nm  
 Fluorescent wavelength: 465nm Fluorescent slit; 10nm

【図 2】

[FIG.2]



Paste cakes 10g + culture medium of Chikuwa (tube-shaped fish cakes),  
homogenize with a Stomacher, dispense 10ml at a time,  
inoculate microbe into the homogenization liquid on the following conditions,

Left :

Add enzyme-induction-agent-to the culture medium,  
6 hours,

Add cAMP (5 mM), IPTG(1 mM ) to 1ml of culture solutions,

Right:

Add enzyme-induction-agent to the substrate,

1ml of culture solutions, 12000 rpm, 5 minutes,

Discard supernatant liquid, add 0.5ml culture solution; and cAMP (5 mM), IPTG,  
(1 mM) to precipitate,

Add 5 micro liters toluene,

40 degrees Celsius, 30 min,

Add 2N NaOH 5 microliters,

15000 rpm, 3 min,

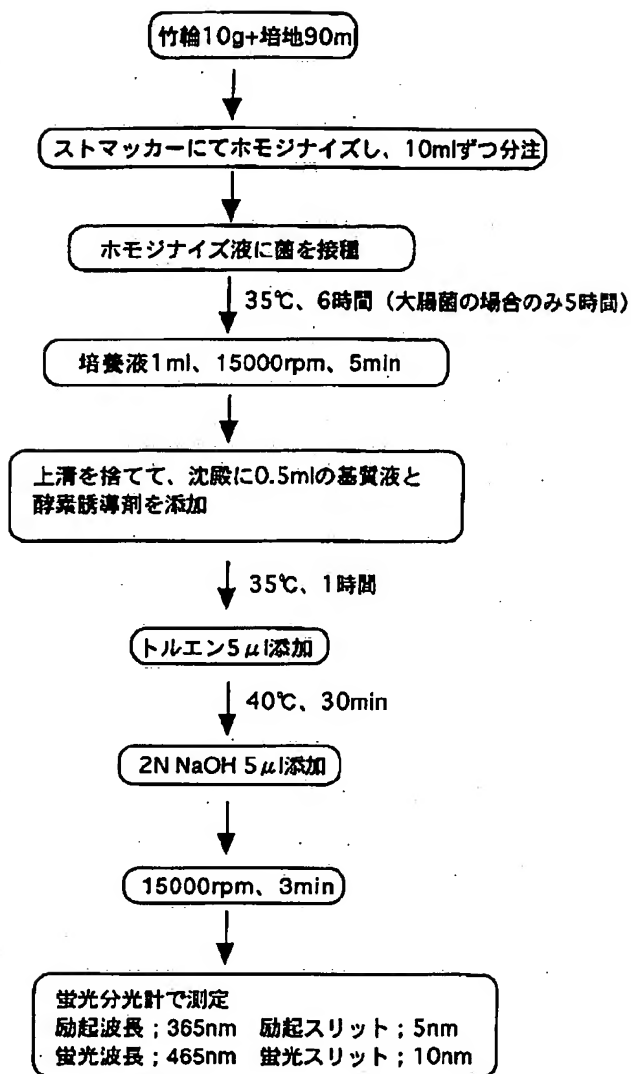
Measure supernatant liquid with fluorescent spectrometer.

Excitation wavelength; 365nm Excitation slit; 5nm,

Fluorescent wavelength: 465nm Fluorescent slit; 10nm

【図 3】

[FIG.3]



Chikuwa 10g + culture medium 90 ml,  
Homogenize in a Stomacher, dispense 10 ml at a time,  
Inoculate bacteria into homogenization liquid,  
35 degrees Celsius, 6 hours (5 hours in the case of coliform bacteria)  
Culture solution 1 ml, 15000 rpm, 5 min  
Discard supernatant, add 0.5 ml substrate liquid and enzyme induction agent to precipitate,  
35 degrees Celsius, 1 hour,  
Add 5 microliters toluene,  
40 degrees Celsius, 30 min,  
Add 5 microliters 2N NaOH,



15000 rpm, 3 min,

Measure supernatant liquid with fluorescent spectrometer.

Excitation wavelength; 365nm, Excitation slit; 5nm,

Fluorescent wavelength: 465nm Fluorescent slit; 10nm

-----



## DERWENT TERMS AND CONDITIONS

*Derwent shall not in any circumstances be liable or responsible for the completeness or accuracy of any Derwent translation and will not be liable for any direct, indirect, consequential or economic loss or loss of profit resulting directly or indirectly from the use of any translation by any customer.*

Derwent Information Ltd. is part of The Thomson Corporation

Please visit our home page:

["WWW.DERWENT.CO.UK"](http://WWW.DERWENT.CO.UK) (English)

["WWW.DERWENT.CO.JP"](http://WWW.DERWENT.CO.JP) (Japanese)